VARIANTES GENÉTICAS DO GENE KAPPA-CASEÍNA EM UMA POPULAÇÃO DE BOVINOS F2¹

AUTORES

Marcos Vinicius G. Barbosa da Silva², Carlos Souza do Nascimento³, Marco Antonio Machado², Mário Luiz Martinez², Ana Lúcia Campos², Marta Fonseca Martins Guimarães²

¹ Financiado parcialmente pelo CNPq e PRODETAB

² Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco – Juiz de Fora – MG, 36038-330 Tel.: (32) 3249-4700 Fax: (32) 3249-4721

E-mail: marcos@cnpqgl.embrapa.br

³ Bolsista de Apoio Técnico da FAPEMIG

RESUMO

O alelo B do gene da kappa-caseína está associado com maior percentagem de proteína no leite em relação ao alelo A, o que torna um forte candidato quando o objetivo da seleção é o aumento na produção de queijo. A análise molecular é ferramenta valiosa para a identificação e monitoramento dos animais possuidores deste alelo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar as variantes alélicas para o gene da kappa-caseína numa população de animais F2 originada do cruzamento Gir x Holandês. Os alelos foram detectados utilizando a técnica de PCR-RFLP, visando detectar as variantes alélicas mais frequentes do gene da kappa-caseína (A, B e E). Os produtos de PCR de 453 pb foram digeridos com as enzimas de restrição *Hinf* I para a detecção dos alelos A e B e *Hae* III para a detecção do alelo E. As frequências alélicas e genotípicas, nos animais da raça Holandesa, mostraram que a frequência do alelo A foi maior às dos demais, e que todos os animais da amostra possuíam esse alelo. Na raça Gir, o alelo A possuía a maior frequência mas, diferentemente da raça Holandesa, não foi encontrado nenhum alelo E. Nos animais F1 e F2, a maior frequência encontrada foi a do alelo A, seguidas pelas frequências dos alelos B e E.

PALAVRAS-CHAVE

Bovinos, kappa-caseína, marcadores moleculares, PCR-RFLP

TITLE

GENETIC VARIANTS OF KAPPA CASEIN GENE IN A BOVINE F2 POPULATION

ABSTRACT

Allele B of kappa casein gene is associated with higher milk protein content compared to A allele what makes it a strong candidate for selection programs aimed at cheese production. Molecular characterization is a valuable tool for identification and monitoring of animals bearing this allele. This work aimed to detect kappa casein alleles in a F2 population derived from Gyr x Holstein cross. The allelic pattern was determined using PCR-RFLP technique in order to detect the most frequent allelic variants (A, B and E). PCR products with 453 bp were digested with *Hinf* I restriction enzyme to detect alleles A and B and *Hae* III restriction enzyme to detect allele E. Allelic and genotypic frequencies in Holstein animals for the A allele were higher than the others and all animals showed this allele. In Gyr breed, A allele showed the highest frequency and no E allele was found as in the Holstein population. In the F1 and F2 populations, A allele was also the most common followed by B and E alleles.

KEYWORDS

bovine, kappa casein, molecular markers, PCR-RFLP

INTRODUÇÃO

Desde o descobrimento do polimorfismo da β -lactoglobulina por Aschaffenburg e Drewry (1995), outras variantes protéicas foram identificadas para a maioria das proteínas lácteas. Essas variações se devem a substituições ou deleções na sequência de nucleotídeos.

O gene da kappa-caseína (CASK) tem sido intensivamente estudado em bovinos devido sua função de estabilização das micelas de caseínas e, portanto, sua influência em propriedades de manufatura do leite. Até o momento, cinco variantes alélicas (A, B, C, D e E) têm sido descritas e, recentemente, outras duas (F e G) foram descobertas (Kaminski, 1996). Vários estudos demonstraram a influência de variantes genéticas da CASK nas propriedades de manufatura do leite, especialmente às relacionadas a produção de queijo, sendo verificado que o leite contendo a variante B tem mostrado melhores propriedades lactodinâmicas do que aquele contendo as variantes A, E ou C, tornando-o passível de seleção quando objetiva-se maior produção de queijo.

Este trabalho teve como objetivo determinar as variantes genéticas do gene da kappa-caseína em uma população de animais F₂ Gir: Holandês.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 410 animais (quatro touros da raça Holandesa, 27 vacas da raça Gir, seis machos e 67 fêmeas F₁ Holandês:Gir, 306 progênies F₂) foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite para extração de DNA e genotipagem para o gene kappa-caseína.

O DNA foi extraído a partir das células brancas isoladas de 10 mL de sangue. Foi utilizado tampão de extração contendo Tris, EDTA, NaCl, SDS e Proteinase K. As proteínas foram removidas com fenol e clorofórmio. As amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro UV GeneQuant Pro, Amersham Biosciences.

Para o estudo do gene da kappa-caseína, foram utilizados os primers CASK-F:5'-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3' e CASK-R:5'-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3' que possibilitaram a amplificação de um fragmento de 453 pb. Visando aumentar a especificidade da reação de PCR, foi utilizada a técnica *Touch Down* nos 10 primeiros ciclos do PCR, com a temperatura inicial de 70 graus centígrados caindo um grau centígrado a cada ciclo de PCR até estabilizar em 60 graus, por 35 ciclos.

Dez uL do produto de amplificação do PCR foram digeridos por 3 horas a 37°C, separadamente com 5 unidades das enzimas de restrição *Hinf* I e *Hae* III (Promega) num volume final de 15 uL. Para a detecção dos fragmentos digerido, foi utilizada eletroforese vertical em gel de poliácridamida nativo (8%), (500 volts, por 1,4 h), com placas com 25 cm, que foram suficientes para garantir perfeita separação dos fragmentos. Os géis foram corados com nitrato de prata e os fragmentos foram identificados com o auxílio dos padrões de 25 pb.

As freqüências dos alelos do gene kappa-caseína para 410 animais foram calculadas por meio de contagem direta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de digestão do produto de PCR mostrando o polimorfismo do gene da Kappa-caseína podem ser visualizados na Figura 1. As freqüências alélicas e genotípicas do gene da kappa-caseína encontram-se na Tabela 1. Verifica-se que nos animais da raça Holandesa, a freqüência do alelo A foi superior às dos demais alelos, destacando-se que todos os animais da amostra possuíam esse alelo.

Por meio da freqüência genotípica, observa-se que, na raça Gir, só havia animais heterozigotos para o alelo B, o qual, de acordo com a literatura, possui efeitos positivos sobre as propriedades de manufatura do leite, especialmente aquelas relacionadas com a produção de queijo. O leite proveniente de animais que possuam a variante B mostra melhores propriedades lactodinâmicas do que o leite que contenha as demais variantes. De acordo com Kaminski (2000), uma substituição de aminoácidos, treonina (ACC) para isoleucina (ATC), no alelo A, e ácido aspártico (GAT) para alanina (GCT), no alelo B (Alexander et al., 1988) confere a esse último uma estrutura da micela da caseína mais apta à iniciação da coagulação e formação de coágulos.

Na raça Gir, o alelo A possuía a maior frequência mas, diferentemente da raça Holandesa, não foi encontrado nenhum alelo E. Resultados semelhantes ao deste estudo, foram encontrados por Machado et al. (2003), que, ao estudar as variantes alélicas do gene da kappa-caseína em 631 animais da raça Gir, criados em dois rebanhos do Estado de Minas Gerais, observaram frequências superiores à 90% para o alelo A, não tendo sido encontrado nenhum alelo E, na amostra.

A razão que pode explicar a baixa frequência do alelo B, nas populações das raças Holandesa e Gir, neste estudo, além do tamanho da amostra, pode ser o fato de que, nos programas de seleção de ambas as raças, as propriedades de manufatura do leite não foram priorizadas, em função da ausência de remuneração da mesma. Normalmente, em programas de seleção de gado de leite, no Brasil, a produção de leite é a característica de maior valor econômico e, portanto, o objetivo de seleção é o aumento dessa característica. Em algumas regiões do Brasil, todavia, aumentos na produção e na percentagem de gordura e de proteína no leite têm também sido objeto de seleção.

Nos animais F₁ e F₂, a maior frequência encontrada foi a do alelo A, seguidas pelas frequências dos alelos B e E. Nessas duas populações, o aumento da frequência do alelo E, se deveu, provavelmente, pelas diferentes intensidades de utilização de touros portando esse alelo.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados, pode-se concluir que as frequências alélicas e genotípicas, na amostra estudada, mostraram que do alelo A foi o mais comum nas raças parentais e nas populações cruzadas, e que todos os animais da amostra possuíam esse alelo. Caso seja estabelecido claramente, por meio da validação desses resultados em rebanhos comerciais brasileiros, que é interessante o aumento da frequência do alelo B de modo a promover a melhoria da qualidade do leite para a produção de queijo, rápidos ganhos podem ser obtidos em função da baixa frequência desse alelo na população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, L.J.; STEWART, A.F.; MACKINLAY, A.G. et al. 1988. Isolation and characterisation of the bovine k-casein gene. *Eur. J. Biochem.*, v.178, p. 395-401.
2. ASCHAFFENBURG, R., DREWRY, J. 1995. Occurrence of different betalactoglobulins in cow's milk. *Nature*, v. 176, n. 1, 218-219, 1995.
3. KAMINSKI, S. 1996.. Bovine kappa-casein (CASK) gene-molecular nature and application in dairy cattle breeding. *J. Appl. Genet.*, v.37, n.1, 179-196.
4. KAMINSKI, S. 2000. Associations between polymorphism within regulatory and coding fragments of bovine kappa-casein gene and milk performance traits. *J. Anim. Feed. Sci.*, v. 9, p. 435-446.
5. MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S., MARTINEZ, M.L. et al. 2003. Variantes genéticas do gene kappa-caseína em bovinos da raça Gir Leiteiro. In: Anais do 49º Congresso Brasileiro de Genética, setembro de 2003, Águas de Lindóia, SP.

Figura 1. Foto do gel nativo de poliacrilamida 5%, corado com nitrato de prata, revelando os polimorfismos do gene da Kappa caseína bovina.

Tabela 1 – Frequências dos alelos A, B e E do gene da kappa-caseína, observadas para 410 animais, de acordo com o grupo genético.

GG ¹	Frequência alélica (%)			Frequência genotípica (%)			
	A	B	E	AA	AB	AE	BE
Holandês	75,00	12,50	12,50	50,00	25,00	25,00	0,00
Gir	92,50	7,50	0,00	84,00	16,00	0,00	0,00
F ₁	82,19	13,02	4,79	64,38	26,03	9,59	0,00
F ₂	82,72	9,23	8,05	68,12	15,77	13,42	2,68

¹ GG = grupo genético, F₁= ½ Holandês: ½ Gir, F₂= F₁xF₂